

不同培养基和模拟胃液对金花菌生长的影响

成苗苗 王昕* 刘金虎

商洛学院健康管理学院

DOI:10.12238/as.v8i1.2686

[摘要] 为了探究不同培养基对金花菌生长的影响,本文比较了察式培养基、20%察式培养基、25%察式培养基、市售马铃薯葡萄糖培养基和自制马铃薯葡萄糖培养基对6种金花菌生长形态的影响。结果表明,6株金花菌在察氏培养基上的生长速度明显快于PDA培养基,*A.cristatus* H-1、*A.amstelodami* S-4、*A.cristatus* S-10、*A.cristatus* H-14和*E.cristatum* H-17推荐使用20%CDA来培养,而*E.cristatum* H-16更适合用25%CDA来培养。还研究了6株金花菌在模拟胃液中的存活率,结果表明,*A.cristatus* S-10、*E.cristatum* H-16和*E.cristatum* H-17第二次模拟胃液驯化后存活率显著高于第一次,说明其耐酸性更好。

[关键词] 茯砖茶; 金花; 模拟胃液

中图分类号: TS272 **文献标识码:** A

The effects of culture medium and simulated gastric juice on the growth of “golden flower” fungus

Miaomiao Cheng Xin Wang* Jinhu Liu

College of Health Management, Shangluo University

[Abstract] In order to explore the effect of media on growth of golden flower, the effects of CDA, 20 %CDA, 25 %CDA, commercial PDA and self-made PDA on growth morphology of 6 isolates were compared. The results showed the growth rate of 6 jinhua on CDA were significantly faster than that on PDA. *A. cristatus* H-1, *A. amstelodami* S-4, *A. cristatus* S-10, *A. cristatus* H-14 and *A. cristatum* H-17 recommended 20% CDA, while *E. cristatum* H-16 was more suitable for growing in 25 %CDA. Moreover, the survival rate of *A. cristatus* S-10, *E. cristatum* H-16 and *E. cristatum* H-17 in second simulated gastric juice was significantly higher than that in first one, which indicated they had a better acid resistance.

[Key words] Fu brick tea; golden flower; simulated gastric juice

引言

茯砖茶是中国六大传统茶类之一的黑茶,它最早起源于陕西泾阳,古时必须在夏季“伏天”生产故而得名“伏茶”^[1]。茯砖茶中“金花”菌的茂盛程度被认为是评判茯砖茶品质优劣的重要指标^[2]。研究表明,“金花”菌具有较明显降脂减肥,抗氧化,抗腹泻等功效,且经常饮用可有效调节人体新陈代谢,增强体质、延缓衰老,起到保健和预防疾病作用^[1,3]。有研究表明^[3],金花菌中曲霉属、散囊菌属和假丝酵母占总测序序列的80%。

虽然,“金花”菌已经被广泛认为是益生真菌应用于食品、饲料、药品等多个领域,如发酵葛根产物、发酵银杏叶、发酵夏秋茶等^[3],但有关其生长特性及体外驯化的基础性研究较少,因此,本文比较了5种不同培养基对6株金花菌生长特性的影响,研究了不同金花菌经过模拟胃液驯化后的存活率,为金花菌体内试验的菌株筛选提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

6株金花菌保藏于商洛学院微生物实验室。仪器:ZXSD-A1160恒温培养箱;ZWY-240恒温培养振荡器;Ni-U光学显微镜。

1.2 培养基制作

察式培养基:硝酸钠3g,磷酸氢二钾1g,七水硫酸镁0.5g,氯化钾0.5g,硫酸亚铁0.01g,蔗糖30g,琼脂15g,蒸馏水定容至1L,煮沸溶解,121℃灭菌15分。20%察式培养基:蔗糖200g,其余同上。25%察式培养基:蔗糖230g其余同上。自制PDA:马铃薯200g,葡萄糖20g,琼脂15~20g,蒸馏水定容至1L。PDB:马铃薯200g,葡萄糖20g,蒸馏水定容至1L。市售PDA:取35g,加入1L蒸馏水中,煮沸溶解。

1.3 菌株活化

将斜面保存的茯砖茶优势菌从4℃冰箱取出,室温放置15~20分钟。放入无菌操作台中,取灭菌竹签挑取菌落,划线于

PDA上, 28℃恒温培养5天, 观察菌落形态。挑取生长良好菌落第二次划线于28℃培养4天, 待用。

1. 4不同培养基对金花菌生长的影响

将6株金花菌分别“点接”到察式、20%察式、25%察式、自制PDA和市售PDA培养基中央, 于28℃恒温培养, 每隔24h记录菌落形态, 并用游标卡尺测量菌落直径。

1. 5孢子悬浮液制备

将斜面保存的金花菌于PDA培养基上活化1~2次, 方法如1. 3. 2。用接种环挑取适量生长良好的黄色闭囊壳于无菌生理盐水, 振荡均匀, 血球计数使得孢子悬浮液浓度为 10^7 CFU/毫升, 即孢子悬浮液。

1. 6胃肠道驯化对不同菌株存活率的影响

用盐酸调节PDB的pH为2~2. 5作为模拟胃液, 取30毫升PDB分装于50毫升三角瓶中, 接种500微升、 10^8 cfu/毫升孢子悬浮液培养, 取100微升培养液涂布于PDA上, 28℃培养数天后计数作为对照1; 上述培养液28℃, 120转/分培养96h后, 取100微升均匀涂布于PDA, 28℃培养数天后计数, 计算首次驯化后存活率: 第一次驯化后平板计数/对照组1 $\times$ 100%。

取首次驯化后的培养液500微升转接到模拟胃液中再次驯化。取100微升培养液涂布于PDA, 28℃培养96h后进行平板计数作为对照2; 将培养液28℃, 120转培养96h后, 取100微升涂布于PDA, 28℃培养数天后计数, 计算再次驯化后存活率: 第二次驯化平板计数/对照组2 $\times$ 100%。

1. 7数据分析

通过Origin9. 0作图, SPSS20. 0作统计学分析。

2 结果与分析

2. 1不同培养基对金花菌生长特性的影响

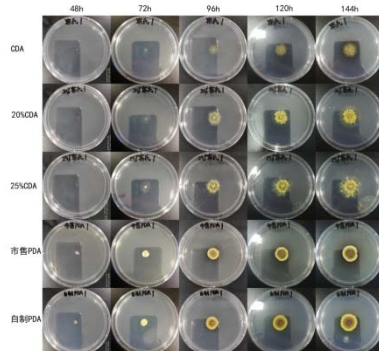


图1 主要金花菌*A. cristatus* H-1在不同条件下的生长形态

图1所示, 代表性金花菌*A. cristatus* H-1从48h到144h的生长形态。可看出, CDA和PDA上的菌落形态明显不同, CDA上菌落呈“散粉”状向外发散、菌落表面干涩不平整, 随着培养时间增加, 菌落越来越大且中心颜色越来越深, 呈深褐色; 而PDA上菌落形态明显较为规整, 呈圆形, 可观察到菌落边缘与培养基有明显分界, 菌落边缘呈浅黄色且越靠近边缘颜色越浅, 菌落中心呈深褐色, 培养时间越长菌落会分泌更多色素物质浸入培养基, 因此颜色越深。

6株分离株表现出同样规律: 在自制PDA上生长速度稍快于市售PDA。另外, 可明显观察到PDA上培养48h时, 菌丝体向外发散, 菌落开始生长, 而CDA培养基上还未观察到菌落生长($d=0$ 毫米), 虽然在生长前期, PDA上菌落生长速度($d>5$ 毫米)明显快于CDA($d=0$ 毫米), 但随培养时间延长, CDA上菌落生长速度(19. 71毫米)明显超过PDA(19. 6毫米), 表现出更大的菌落直径, 说明在培养前期, 金花菌能更快适应含大量碳水化合物的培养基如PDA, 随着培养时间延长, 也能适应含有微量营养素培养基如CDA。

表1 金花菌在不同培养基上生长的菌落直径

名称		菌落直径 (mm)				
		48h	72h	96h	120h	144h
<i>A. crista</i> <i>tus</i> H-1	CDA	—	8.39±0.21	12.84±0.23	16.03±0.37	19.71±0.04
	20%CDA	—	13.15±1.00	20.15±1.21	25.15±0.69	31.60±1.36
	25%CDA	—	15.61±1.00	22.76±0.91	27.62±2.29	33.27±2.00
	市售PDA	5.98±0.15	9.35±0.21	13.14±0.21	16.25±0.16	19.60±0.06
	自制PDA	5.38±0.69	9.98±0.65	14.85±0.35	18.57±0.19	21.88±0.68
<i>A. amstel</i> <i>odami</i> S-4	CDA	—	9.07±1.23	13.29±0.98	16.49±0.64	20.26±1.04
	20%CDA	—	14.12±1.67	19.93±0.61	25.61±1.24	31.12±0.55
	25%CDA	—	15.25±1.87	22.58±0.63	26.81±0.66	32.46±1.32
	市售PDA	5.68±0.32	9.00±0.68	12.05±0.62	20.97±7.59	18.01±1.07
	自制PDA	6.14±0.17	9.92±0.19	13.59±0.45	16.04±1.65	19.14±1.93
<i>A. crista</i> <i>tus</i> S-10	CDA	—	9.33±0.18	12.95±0.06	17.11±0.65	19.83±0.58
	20%CDA	—	13.75±0.46	20.10±0.64	26.08±0.75	31.61±0.30
	25%CDA	—	14.45±0.55	21.35±1.90	27.69±0.21	32.81±0.89
	市售PDA	6.04±0.02	9.62±0.28	12.55±0.23	15.72±0.02	19.46±0.50
	自制PDA	6.04±0.48	10.18±0.55	13.21±0.44	16.61±0.23	19.84±0.05
<i>A. crista</i> <i>tus</i> H-14	CDA	—	8.12±0.21	12.06±1.19	15.57±1.20	18.73±1.53
	20%CDA	—	11.48±2.70	18.77±2.24	24.04±3.06	28.90±4.07
	25%CDA	—	15.20±0.14	21.45±0.16	25.89±1.09	32.31±1.00
	市售PDA	5.38±0.08	8.67±0.04	12.58±0.39	15.77±0.68	14.36±6.95
	自制PDA	5.31±0.56	9.67±0.75	14.16±1.19	17.34±1.10	20.75±0.57
<i>E. crista</i> <i>tum</i> H-16	CDA	—	9.43±0.16	20.86±0.35	26.13±0.23	29.33±4.21
	20%CDA	—	11.10±2.46	12.36±0.12	16.26±0.14	19.62±0.55
	25%CDA	—	12.46±3.93	23.42±0.49	29.29±1.16	34.79±1.43
	市售PDA	6.59±0.06	9.96±0.39	13.94±0.41	17.16±0.29	20.67±0.45
	自制PDA	8.29±0.35	12.19±0.28	16.78±0.24	20.23±0.28	23.49±0.02
<i>E. crista</i> <i>tum</i> H-17	CDA	—	7.56±0.31	12.20±0.26	16.20±0.21	19.57±0.17
	20%CDA	—	14.15±0.92	20.73±1.80	26.57±1.34	32.57±0.95
	25%CDA	—	13.03±2.79	22.81±1.15	27.58±0.49	33.82±1.25
	市售PDA	5.93±0.11	9.89±0.39	13.07±0.28	16.67±0.02	19.84±0.15
	自制PDA	6.57±0.03	10.08±0.03	14.61±0.49	18.14±0.78	21.20±0.18

注: “—”表示菌株未生长; 表中的菌落直径表示为“平均值 $\pm$ 标准值”。

另外, 从表1可看到, 6株金花菌在自制PDA上菌落直径均大于市售PDA, 说明自制PDA上营养成分更适合金花菌生长, 其中含有更多新鲜淀粉类营养素。金花菌在CDA上生长速度表现为: 25%CDA最快, 20%CDA次之, CDA最慢, 但25%CDA和20%CDA上菌落直径无显著性差异; 而*E. cristatus* H-16在25%CDA上生长最快, CDA次之, 生长最慢的是20%CDA。说明不同菌株对于培养基的依赖性是不同的。

2. 2模拟胃液驯化后金花菌存活率比较

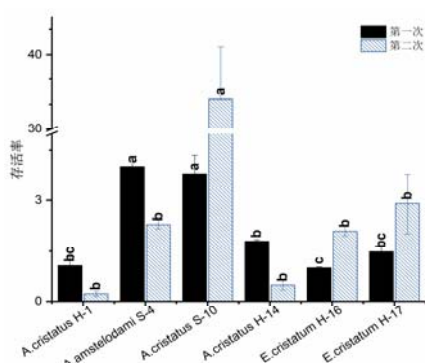


图2 分离株胃肠道驯化后的存活率

如图2, 经一次模拟胃液驯化, *A. amstelodami* S-4和*A. cristatus* S-10存活率最高, 且与其他菌株存在显著差异($p < 0.05$); 经二次驯化, 可明显观察到*A. cristatus* S-10存活率远远高于其他菌株, 并存在显著性差异($p < 0.05$), *A. cristatus* S-10、*E. cristatum* H-16和*E. cristatum* H-17的存活率较第一次明显提高, 而*A. cristatus* H-1、*A. amstelodami* S-4和*A. cristatus* H-14存活率反而降低。说明*A. cristatus* S-10、*E. cristatum* H-16和*E. cristatum* H-17耐酸性明显好于其他三株金花菌, 更适合用来体内评价。

3 结论

以6株金花菌为研究对象, 经不同培养上生长形态筛选, 得出以下结论: 在CDA上, *A. cristatus* H-1、*A. amstelodami* S-4、

A. cristatus S-10、*A. cristatus* H-14和*E. cristatum* H-17在20%CDA和25%CDA上生长速度和菌落形态基本一致, 考虑到节约成本的原则, 推荐使用20%CDA培养; *E. cristatum* H-16在25%CDA上生长最快, 推荐使用25%CDA培养。在PDA上, 6株金花菌在自制PDA上生长速度快于市售PDA, 说明自制PDA中土豆中淀粉类营养素更适合金花菌生长, 推荐采用自制PDA。虽然6株金花菌在PDA上从48h就开始生长, 但同样培养时长, PDA上菌落直径远小于CDA, 因此CDA更适合金花菌培养。经模拟胃液筛选, 认为*A. cristatus* S-10、*E. cristatum* H-16和*E. cristatum* H-17耐酸性更好, 更适合体内评价。

[基金项目]

陕西省大学生创新训练项目(S202411396057), 商洛学院自然科学研究项目(22SKY110, 22HKY192)。

[参考文献]

- [1]侯爱香, 李宗军, 李珂. 茯砖茶的历史、流通和加工[J]. 轻工科技, 2015, 31(09): 1-3.
- [2]吕嘉枬, 马师君, 康婕. 茯砖茶中的金花菌对羊乳酪蛋白的影响[J]. 陕西科技大学学报, 2022, 40(04): 54-60+66.
- [3]张六六, 王亚, 吴燕. 冠突散囊菌发酵夏秋茶工艺优化研究[J]. 安徽农业科学, 2020, 48(09): 174-176.

*通讯作者:

王昕(1993--), 女, 汉族, 陕西扶风人, 博士, 讲师, 研究方向: 食品安全控制。